

# 环胞苷 (CC) 与无环鸟苷 (ACV) 对小鼠三叉神经节内潜伏单纯疱疹病毒的作用

刘卫国 马镇西 陈祖基 宋洁贞

(河南省眼科研究所, 郑州)

**提要** 本文用试管内复活的 HSV-1 模型研究了 CC 和 ACV 对小鼠三叉神经节内潜伏 HSV 的作用。实验显示 CC 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  和 ACV 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  对潜伏病毒复活有明显抑制作用, CC 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  能达到与 ACV 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  相当的作用强度, 但在除去药物后其作用的维持时间不如 ACV 长。持续提供药物可以阻止潜伏病毒在试管内复活, 即使采用间断给药方法亦不能完全排除潜伏病毒, 但可以显著降低神经节内病毒滴度。二药联合应用对抑制潜伏病毒复活有协同作用。

**关键词** 环胞苷; 无环鸟苷; 三叉神经节; 潜伏感染; 单纯疱疹病毒

单纯疱疹病毒 (HSV) 性角膜炎复发的主要原因是 HSV 在宿主三叉神经节内建立了潜伏感染<sup>(1)</sup>。目前公认抗病毒化疗是最有希望排除和控制潜感的方法之一, 现有药物预防给药可以阻止神经节潜伏感染的建立, 对已建立的潜伏感染则无效<sup>(3~7)</sup>。无环鸟苷 (Acyclovir, ACV) 被证实在试管内能有效地阻止潜伏 HSV 复活<sup>(6,8,9)</sup>, 但对早已用于眼科临床, 并证明对各型 HSV 角膜炎有良好疗效的环胞苷 (2,2'-O-Cycloctidine, CC)<sup>(2)</sup>, 至今未见到有关报道。本研究用试管内复活的潜感模型试验 CC 和 ACV 对小鼠三叉神经节内潜伏 HSV-1 的作用, 并对二药联合的效果和间断用药排除潜伏病毒的可能性进行了初步的实验探讨。

## 材 料 与 方 法

本实验用 HSV-1 SM 44 株和传代非洲绿猴肾细胞 (Vero) 均由中国预防医学中心病毒所提供, 用 Eagle's 基础培养基培养。纯系 615 小鼠, 雌雄各半, 由河南医学院动物园提供, 体重 15~18 g。本实验用 CC 和 ACV 分别由上海第十二制药厂和湖北医药工业研究所供给配成 1% 储备液 -10°C 保存备用。

**病毒接种** 按文献<sup>(4)</sup>方法, 每鼠双侧角膜各接种滴度为  $10^{3.5}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$  (10  $\text{LD}_{50}$ ) 的 HSV-1 稀释液 10  $\mu\text{l}$ 。

**测定三叉神经节内病毒滴度** 病毒接种后 3~8 周处死小鼠, 分离脑组织取出左右三叉神经节, 用 Hank's 液漂洗后随机分组, 按实验设计进行一定时间的有药或无药培养, 在预定时间取出神经节, 用研磨器制成匀浆, 冻融三次, 取神经节匀浆悬液 0.1 ml, 种入 Vero 细胞单层的培养液中, 37°C 培养, 逐日观察细胞病变情况, 共 14 天。神经节匀浆中复活病毒的滴度通过在 Vero 细胞上进行  $\text{TCID}_{50}$  测定。

## 结 果

### (一) 药物毒性

1. 对 Vero 细胞毒性的形态学检查 将不同稀释度药液加入 Vero 细胞管中培养, 结果

显示 CC 100  $\mu\text{g/ml}$  和 ACV 1000  $\mu\text{g/ml}$  可致明显细胞形态改变, 均显著高于本实验所用药物浓度。

2. 对神经节组织毒性的病理学检查 剖取正常小鼠三叉神经节, 分别与 CC 25  $\mu\text{g/ml}$  或 ACV 10  $\mu\text{g/ml}$  共同培养 4 天, 然后固定、切片、染色, 病理学检查证实与正常神经节组织切片无明显差异。

### (二) CC 和 ACV 阻止神经节潜伏 HSV 复活的浓度

用 Eagle's 液将 CC 储备液稀释成每 ml 含 5, 10, 25 和 50  $\mu\text{g}$  4 个浓度, ACV 稀释成每 ml 含 1, 2.5, 5 和 10  $\mu\text{g}$  4 个浓度, 随机将每 12 个神经节分为一组, 各加入不同浓度药液 2 ml, 37°C 培养 4 天, 除去药物后 0 天进行病毒滴定。同等条件下作无药神经节和细胞对照。

实验显示: CC 10  $\mu\text{g/ml}$  和 ACV 2.5  $\mu\text{g/ml}$  对试管内潜伏病毒复活有明显抑制作用, CC 25  $\mu\text{g/ml}$  和 ACV 10  $\mu\text{g/ml}$  抑制作用最大 (图 1), 在该浓度时, CC 和 ACV 的  $\text{TCID}_{50}$  值均较无药对照组下降 3 个对数值。

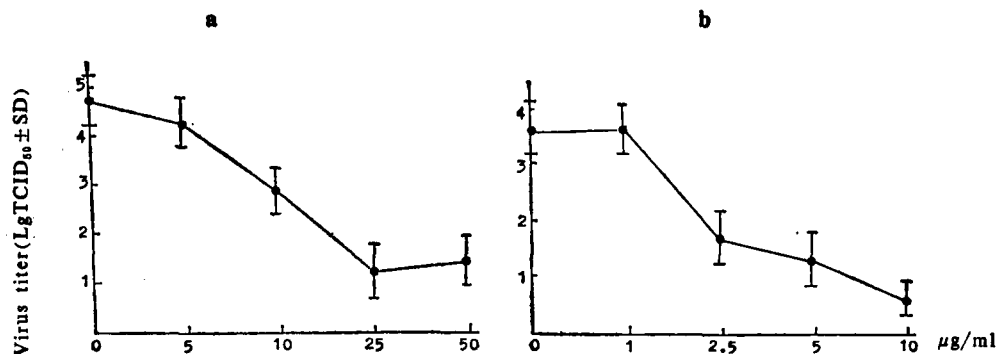


Fig 1. Effect of drugs on *in vitro* reactivation of latent HSV. a=CC, b=ACV

### (三) CC 和 ACV 阻止 HSV 复活作用的持续时间

配制 CC 25  $\mu\text{g/ml}$  和 ACV 10  $\mu\text{g/ml}$  的药液, 随机将每 6 个神经节分为一组, 分别加入 1 ml 不同药液, 37°C 培养 4 天。洗去药物, 分别于移入无药培养基后的 1, 2, 3 和 4 天取出神经节进行病毒滴定, 同等条件作无药神经节和细胞对照。

经 CC 25  $\mu\text{g/ml}$  培养 4 天的神经节, 移入无药培养基后 1 天病毒滴度的  $\text{TCID}_{50}$  值为  $10^{3.23}$ , 与无药对照组相比有显著差异 ( $P < 0.001$ ), 但其抑制作用已较停药 0 天下降了 50%。无药培养 2 天的神经节病毒滴度与无药对照组相比无明显差异 ( $P > 0.05$ )。说明除去药物后, CC 对潜伏病毒复活的抑制作用仅能维持 1 天。经 ACV 10  $\mu\text{g/ml}$  培养 4 天的神经节, 停药后 1 和 2 天的病毒滴度分别比对照组降低 3.33 和 3.51 个对数值 ( $P < 0.001$ ), 抑制病毒复活作用与停药 0 天相同; 第 3 天病毒滴度较对照组降低 1.27 个对数值 ( $P < 0.01$ ), 抑制作用较 0, 1 和 2 天降低 60%; 第 4 天与对照组相比已无明显差异。说明 ACV 对潜伏 HSV 复活的抑制作用可维持到除去药物后的第 3 天。(见表 1)

Tab 1. The effect of CC and ACV on in vitro reactivation of latent HSV in TG

Group	Antiviral in medium (Days)	Viral titer (LgTCID <sub>50</sub> ±SD)*			
		Days after removal of drug from medium			
		1	2	3	4
Control	4	5.00±0.44	4.34±0.49	4.50±0.41	4.50±0.41
CC(25μg/ml)	4	3.23±0.48****	4.50±0.41**	4.00±0.54**	5.00±0.44*
ACV(10μg/ml)	4	1.67±0.36****	0.83±0.48****	3.23±0.48***	4.00±0.44*

a. Each value represents the mean of 6 ganglia.

b. P value is significant level of difference between drug treated group and drug-free control group on the same day. \*P>0.2; \*\*P>0.05; \*\*\*P<0.01; \*\*\*\*P<0.001

#### (四) CC 和 ACV 对先在试管内复活潜伏 HSV 的作用

CC 和 ACV 药液配制同上, 随机将每 6 个神经节分为一组, 每组先经无药 Eagle's 液 1 ml 培养 3 天使潜伏 HSV 复活, 然后移入 CC 25 μg/ml 或 ACV 10 μg/ml 药液中培养 4 天。洗去药物, 分别于移入无药培养液的 0, 1 和 2 天进行病毒滴定。同等条件下作无药神经节和细胞对照。

实验显示: 潜感神经节先经无药培养 3 天使 HSV 复活, 再用 CC 25 μg/ml 培养 4 天, 停药后 0 天病毒滴度的 TCID<sub>50</sub> 值是 10<sup>3.5</sup>, 与无药对照组比较仅下降 1 个对数值, 但差异仍非常显著(P<0.05); 停药后 1 天病毒滴度与对照组比较已无明显差异(P>0.1)。ACV 组停药后 0 和 1 天病毒滴度较对照组分别下降 2.27 和 2.44 个对数值, 差异非常显著(P<0.001); 停药后 2 天病毒滴度与对照组比较无明显差异(P>0.20)。说明 ACV 的作用强度和维持时间均明显优于 CC。

#### (五) CC 和 ACV 间断用药对神经节潜伏 HSV 的作用

潜感神经节 48 个, 随机分为 4 组。两组分别先经 CC 25 μg/ml 或 ACV 10 μg/ml 药液培养 3 天, 再移入无药培养液中 3 天为一周期, 共处理 3 个周期; 另两组分别在无药培养液中培养 3 和 18 天, 取出后进行病毒滴定。

结果显示: 经 37°C 培养 18 天的对照组神经节仍显示高滴度的病毒活性, TCID<sub>50</sub> 值为 10<sup>3.5</sup>, 培养 3 天的对照组神经节病毒滴度为 10<sup>3.83</sup>, 二组无显著差异(P>0.20)。说明长达 18 天 37°C 培养的热灭活作用并没有明显影响潜伏病毒的滴度。在 CC 和 ACV 处理组, 神经节病毒滴度的 TCID<sub>50</sub> 值分别为 10<sup>0.5</sup> 和 10<sup>1.0</sup>, 与无药对照组相比分别降低 3.0 和 2.5 个对数值(P<0.001)。

#### (六) CC 和 ACV 联合用药对神经节潜伏 HSV 的作用

按实验 2 所得 CC 和 ACV 最大无效浓度配制药液 (CC 5 μg + ACV 1 μg)/ml。随机将每 13 个神经节分为一组。一组加上述药液, 另一组加无药培养液作对照, 37°C 培养 4 天。除去药物后 0 天进行病毒滴定。

实验显示: 经药液培养 4 天的神经节, 除去药物后 0 天病毒滴度的 TCID<sub>50</sub> 值为 10<sup>2.0</sup>, 较无药对照组下降 2.76 个对数值(P<0.001), 接近 CC 25 μg/ml 或 ACV 10 μg/ml 单独用药的作用强度(表 2)。CC 5 μg/ml 或 ACV 1 μg/ml 单独用药对潜伏 HSV 的复活无抑制作用的。说明 CC 和 ACV 最大无效浓度联合用药对潜伏病毒的体外复活有协同抑制作用。(见表 2)

Tab 2. The effect of combination of CC and ACV on reactivation of HSV

Group	Viral titer (LgTCID <sub>50</sub> ±SD)*
Control	4.76±0.36
CC+ACV	2.00±0.52
Control	4.87±0.50
CC (5μg/ml)	4.40±0.51
Control	3.62±0.45
ACV (1μg/ml)	3.71±0.44

\* Each value represents the mean of 13 ganglia, \* P<0.05, \*\* P<0.001

## 讨 论

本实验结果表明：CC 和 ACV 可以抑制三叉神经节内潜伏 HSV 在试管内复活。ACV 2.5 μg/ml 即有明显抑制作用，10 μg/ml 时作用最大，这与文献<sup>(6)</sup>报告 5~10 μg/ml 的结果相似。CC 10 μg/ml 表现明显抑制作用，25 μg/ml 时能达到与 ACV 10 μg/ml 相当的作用强度，但其作用维持时间不如 ACV 长，CC 仅维持 1 天，ACV 可维持 3 天，ACV 的作用明显优于 CC。

另外，病毒复活后的处理也不能完全排除神经节内的潜伏 HSV，只是降低了它的滴度。对此可能的解释是潜伏 HSV 的复活不是同步的，一次复活后的处理只能排除部分而不是全部潜伏 HSV，所以 Pavan-Langston 和 Kaufman 等人<sup>(4,10)</sup> 主张通过交替应用药物和无药周期的方法，减少直至排除全部潜伏 HSV 或者能控制疾病的临床复发，以减轻甚至消除复发造成的眼部损害。我们的实验 4 结果显示，经过 3 个周期的药物~无药处理，也只是大大降低了潜伏 HSV 滴度，并没有达到完全排除潜伏 HSV 的目的。至此可以认为：HSV 潜感涉及的有关基础理论问题尚未完全解决，潜伏期 HSV 基因组的确切状态尚不清，这就不可能对此进行更有理性的探讨，排除和控制神经节潜伏 HSV 的可能性是存在的，但远非我们目前的手段所能及。

在 HSV 感染实验研究中，常采用联合用药方式，以提高疗效，降低毒性，减少耐药株的产生。Jang<sup>(11)</sup> 和 Vanell<sup>(12)</sup> 等的实验结果均证实：抗病毒药物联合应用表现出不同程度的相加甚至协同作用。但 CC/ACV 联合用药对三叉神经节潜伏 HSV 的作用尚未见报道。我们的初步实验结果表明：二药联合对潜伏 HSV 复活有协同抑制作用，CC 和 ACV 分别作用于不同酶系统，但最终均导致对 DNA 合成的抑制<sup>(13)</sup>。ACV 作用于病毒特异酶，选择性好，毒性小，但水溶性差；CC 虽特异性较差，但也有较强抗 HSV 作用，水溶性好<sup>(13)</sup>。二药联合，扬长避短，是很有前途的用药方法。

## 参 考 文 献

1. 马镇西. 单纯疱疹性角膜炎的临床与治疗问题. 角膜病杂志 1980; 2:113.
2. 河南省眼科研究所. 环胞苷治疗实质型单纯疱疹性角膜炎的临床观察. 中华医学杂志 1977; 8:496.
3. Wohlenberg C, et al. In vitro system for studying the efficacy of antiviral agents in preventing the reactivation of latent herpes simplex virus. *Antimicrob Agents Chemother* 1979; 15:625.
4. Pavan-Langston D, et al. Ganglionic herpes simplex and systemic Acyclovir. *Arch Ophthalmol* 1981; 99:1417.
5. Field HJ and De Clercq E. Effects of oral treatment with ACV and BVDU on the establishment and

- maintenance of latent HSV infection in mice. *J Gen Virol* 1981; 56:259.
6. Klein RJ, et al. Effect of Acyclovir on latent HSV infections in trigeminal ganglia of mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1981; 19:937.
  7. Trousdale MD, et al. Effect of Acyclovir on acute and latent HSV infections in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sic* 1980; 19:1336.
  8. Park NH, et al. Effect of Acyclovir, Bromovinyldeoxyuridine, Vidarabine, and L-lysine on latent ganglionic HSV *in vitro*. *Am Med J* 1982; 73:151.
  9. Klein RJ. Treatment of experimental latent HSV infections with Acyclovir and other antiviral compounds. *Ibid* 1982; 73:138.
  10. Kaufman HE, et al. Oral antiviral drugs in experimental herpes simplex keratitis. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 24:888.
  11. Janz C and Wigand R. Combined interaction of antiherpes substances and interferon on the multiplication of HSV. *Arch Virol* 1982; 73:135.
  12. Varnell ED, et al. Antiviral drug combinations for the treatment of experimental herpetic keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sic (ARVO suppl)* 1983; 24:215.
  13. 陈祖基. 眼科药物药理. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1982:103~141.

## THE EFFECTS OF 2, 2'-O-CYCLOCYTIDINE (CC) AND ACYCLOVIR (ACV) ON LATENT HERPES SIMPLEX VIRUS IN TRIGEMINAL GANGLIA OF MICE

LIU Wei-Guo, MA Zhen-Xi, CHEN Zu-Ji and SONG Jie-Zhen

(Henan Institute of Ophthalmology, Zhengzhou)

**ABSTRACT** Effects of CC and ACV on latent HSV in trigeminal ganglia were studied by reactivated HSV-1 model *in vitro*. Both CC (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and ACV (2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) were shown to significantly inhibit the reactivation of the latent HSV in infected ganglia. The effect of CC 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  was as strong as that of ACV 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , but the effect of CC did not last as long as that of ACV after removal of the drugs. The latent state of HSV *in vitro* was dependent upon the continuous presence of either drug. Even though either drug was discontinuously administered, the latent HSV was not eliminated completely from the trigeminal ganglia. Its titers, however, were significantly reduced. The combination of CC and ACV showed a synergistic effect on preventing the reactivation of the latent HSV *in vitro*.

**Key words** 2,2'-O-Cyclocytidine; Acyclovir; Trigeminal ganglia; Latent infection; Herpes simplex virus